

## · 研究报告 ·

## 肝郁脾虚证大鼠模型肝脏的差异基因表达

王玉杰<sup>1</sup>, 谢鸣<sup>2</sup>( <sup>1</sup>厦门大学医学院中医系, 厦门 361005; <sup>2</sup>北京中医药大学国家重点方剂学学科, 北京 100029 )

**摘要:** 目的: 研究肝郁脾虚证大鼠模型肝脏的差异基因表达。方法: 大鼠随机分为正常对照组、肝郁脾虚证模型组2组, 每组12只。采用慢性束缚+过度疲劳+饮食失节法, 连续28d造模, 正常对照组不予处理。于制模第29d, 处杀2组大鼠, 待测肝脏全基因探查。结果: 肝郁脾虚证模型大鼠肝脏差异表达的基因59个, 其中上调基因27个, 下调基因32个。在上调的27个基因中, 目前已知的功能基因有Scd1、Dbp、Upp2、Slc28a2、Sds、Hpn、Gldc、Tm7sf2、Gcat。结论: 肝郁脾虚证存在异常基因表达, 涉及脂类代谢、糖代谢等多个方面。提示多个基因的异常表达可能是中医肝郁脾虚证的分子基础。

**关键词:** 肝郁脾虚证; 肝脏; 差异基因表达

**基金资助:** 国家自然科学基金资助项目 (No.10002902-233-12)

### Differential gene expression on syndrome model of stagnation of liver and deficiency of spleen in rats

WANG Yu-jie<sup>1</sup>, XIE Ming<sup>2</sup>( <sup>1</sup>TCM Department of Medical College of Xiamen University, Xiamen 361005, China; <sup>2</sup>National Key Formulas of Chinese Medicine Discipline, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China )

**Abstract:** Objective: To analyze differential gene expression on syndrome model of stagnation of liver and deficiency of spleen in rats. Method: The rats were assigned to two groups randomly: normal group, model group of stagnation of liver and deficiency of spleen, 12 rats in each group. The rats of model group were administrated by chronic restricting and excess fatigue without constant diet for 28 days and normal group rats were fed as usual. All genes in rat liver were observed. Conclusion: There are 59 differentially expressed genes in model group, genes, among them, 27 genes are upregulation and 32 downregulation, referring to inquest known functional genes as followed: Scd1, Dbp, Upp2, Slc28a2, Sds, Hpn, Gldc, Tm7sf2, Gcat. Polygenic abnormal expression is the cause of syndrome model of stagnation of liver and deficiency of spleen in rats.

**Key word:** Syndrome of stagnation of liver and deficiency of spleen; Liver; Differential gene expression

**Fund assistance:** National Natural Science Foundation of China (No.10002902-233-12)

基因芯片技术不仅具有较高的可靠性和稳定性, 而且可以同时检测大量基因的表达, 为阐述基因功能、探索疾病病因及发病机制, 提供了可能的探测手段。本研究将运用差异基因表达的检测技术, 探查肝郁脾虚证模型大鼠肝脏差异基因表达, 以为深入了解中医肝郁脾虚证的生物学内涵提供线索。

#### 材料

1. 动物 健康Wistar大鼠, 雌雄各半, 体质量(240±10)g, 级别SPF/VAF, 动物许可证号为SCXK(京)2007-0001, 由北京维通利华实验动物中心提供。

2. 试剂 M-MLV (Invitrogen 公司); Trizol试剂 (Invitrogen 公司); T7-oligo(dT)、Random Primer (9N), 2.4mM (dATP, dTTP, dGTP)、1.2mM (dCTP) (博亚公司); DEPC (Sigma 公司产品); Control RNA (北京博奥生物有限公司); 甲酰胺

(Formamide, Sigma公司产品); T7 RiboMAX ExpressLarge Scale Production System、dNTP (10mM each), (Promega 公司); Cy3-dCTP、Cy5-dCTP, (Amersham 公司); Klenow Fragment (Takara 公司); RNeasy Mini kit (QIAGEN 公司); Nucleospin RNA Clean-up、Nucleospin Extract II, (MN 公司); MOPs (Boehringer公司产品); 溴酚蓝(Bromphenol Blue, Sigma公司产品)。

3. 仪器 PTC-225型PCR仪(MJ Research公司); 5810R 型台式离心机(Eppendorf 公司); 核酸浓缩仪(Eppendorf concentrator 5301) (Eppendorf 公司); DU640 型紫外分光光度计(Beckman 公司); 紫外交联仪(BIO-RAD公司); 水浴锅(memert公司); 杂交盒(CapitalBio公司); TDK-2型水平摇床(北京通达科技有限公司); LuxScan-10KA型芯片扫描仪(CapitalBio公司)。

通讯作者: 谢鸣, 北京市北三环东路11号北京中医药大学基础医学院方剂学教研室, 邮编: 100029, 电话: 010-64286992

E-mail: xieming603@263.net

造模用束缚器:自制,为有机玻璃制成的圆筒状结构,主筒长25cm,筒口外径7cm,内径5cm;前端置有一直径小于主筒的、可以前后调节的带有透气孔、便于大鼠头伸进的有机玻璃前罩,后端为可调的开关闸门。

4. 计算软件 SAM软件:北京博奥生物有限公司提供。

## 方法

1. 制模方法 采用慢性束缚应激+过度疲劳+饮食失节的方法<sup>[1]</sup>。

2. 分组处理 大鼠随机分为正常对照组、肝郁脾虚证模型组2组,每组12只。肝郁脾虚证模型组按上述制模方法处理,连续28d;正常对照组不加任何刺激,自然饲养。于第28日PM8:00,全部动物禁食,第29日AM8:00在冰上迅速取约 $5 \times 5 \times 5 \text{ mm}^3$ 的肝组织,放入液氮中,待做全基因探查。

## 3. 全基因表达探查

3.1 肝脏RNA的提取 Trizol (Invitrogen, Gaithersburg, MD, USA) 一步法提取肝组织中的总RNA,通过异丙醇沉淀法浓缩RNA,并进一步采用NucleoSpin® RNA clean-up试剂盒 (MACHEREY-NAGEL, Germany) 对总RNA进行过柱纯化,最后用分光光度计定量,甲醛变性胶电泳质检。

## 3.2 样品 RNA 的荧光标记

3.2.1 反转录合成1st-strand cDNA:以Total RNA或mRNA起始,含有T7启动子序列的T7 Oligo (dT) Primer为引物,使用CbcScript 酶合成1st-strand cDNA。

3.2.2 合成2nd-strand cDNA:用RNase H将杂合链中的RNA切成短片段, DNA Polymerase以RNA短片段为引物延伸,合成2nd-strand cDNA,并纯化双链cDNA。

3.2.3 体外转录合成cRNA:以cDNA为模板,利用T7 Enzyme Mix合成cRNA;然后用RNA Clean-up Kit (MN) 纯化。

3.2.4 随机引物反转录:取 $2 \mu\text{g}$  cRNA,用CbcScript II 酶, Random Primer 进行反转录,反转录产物用PCR NucleoSpinExtract II Kit (MN) 纯化。

3.2.5 cDNA用KLENOW酶标记:取上述反转录产物,以 Random Primer为引物进行KLENOW酶标记,标记产物用PCR NucleoSpinExtract II Kit (MN) 纯化,纯化后抽干。Cy5-dCTP、Cy3-dCTP (GE Healthcare Cat. No. PA 55021/ PA53021)。

3.3 杂交与清洗 标记的DNA溶于 $80 \mu\text{L}$ 杂交液中( $3 \times \text{SSC}$ , 0.2%SDS,  $5 \times \text{Denhart's}$ , 25%甲酰胺),于 $42^\circ\text{C}$ 杂交过夜。杂交结束后,先在 $42^\circ\text{C}$ 左右含0.2%SDS,  $2 \times \text{SSC}$ 的液体中洗5min,而后在 $0.2 \times \text{SSC}$ 中室温洗5min。玻片甩干后即用于扫描。

3.4 芯片扫描 芯片用 LuxScan 10KA双通道激光扫描仪 (CapitalBio公司) 进行扫描。扫描像素值:设置为 $10 \mu\text{m}$ ; PMT (90%) 数值:设置为90;扫描区域值:取最大值或根据实际情况选择。通过split TIFF软件将图像分割成Cy3、Cy5单色,并以Tiff文件格式保存,待分析。

## 3.5 芯片图像的采集与数据分析

3.5.1 分析处理:采用LuxScan 3.0图像分析软件 (CapitalBio公司) 对芯片图像进行分析,把图像信号转化为数字信号。

3.5.2 差异表达基因筛选:单张芯片,以ratio=2倍或1.5倍标准筛选差异表达基因 (ratio=Cy3/Cy5);每个基因有3个重复ratio,用SAM软件进行分析, FDR控制在5%以内,  $|\text{Score}| > 2$  再以Fold Change=2倍或1.5倍标准筛选差异表达基因。(Fold Change=对照A ratio均值/对照B ratio均值, Score=A基因ratio的平均值-所有基因ratio的平均值/所有基因方差)。

## 3.6 统计学方法 采用SAM 软件计算。

3.7 差异基因功能查询 筛选的差异表达基因其功能查询主要在如下网站进行: <http://www.biorag.org/>; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>; <http://www.ebi.ac.uk/embl/>; <http://www.geneontology.org/>; <http://www.genome.ad.jp/kegg/>。

表1 肝郁脾虚证模型大鼠肝脏上调基因

上调基因编码	上调基因名称	Fold Change
R000097_01	Scd1	5.4975
R002261_01	Dbp	5.3414
Rn30004787	Upp2	3.8462
Rn30026876	LOC691960 Slc28a2	3.5463
Rn30001261	Sds	3.3878
Rn30019470	Hpn	3.2418
Rn30010685	Gldc	3.0268
Rn30014572	Bub1	3.0023
Rn30019355	Tm7sf2	2.9951
Rn30009757	Gcat	2.8982
Rn30019170	Cyp2b3	2.8699
Rn30001176	Prkar1b	2.6070
R004169_01	Slc2a2	2.5932
Rn30013157	Slc39a4	2.4045
Rn30016261	Slc2a5	2.3904
Rn30009202	Tymp	2.3390
Rn30012825	Idh2	2.3302
R002272_01	Cyp3a23/3a1	2.2207
Rn30005624	Mdm2	2.2199
R002393_01	Hhex	2.1671
Rn30015163	Dgat2	2.1657
R004637_01	Rnf39	2.1482
Rn30009474	Ptger3	2.1104
R002020_01	Foxa2	2.0779
Rn30002159	Trim41	2.0471
Rn30008808	Pfkm	2.0182
Rn30001127	Snx8	2.0008

## 结果

1. 肝郁脾虚证模型差异表达基因 见表1-表2。表1和表2所示,与正常对照组相比,肝郁脾虚证模型大鼠的肝脏差异表达基因共有59条,其中上调基因有27条,下调基因有32条。

表2 肝郁脾虚证模型大鼠肝脏下调基因

下调基因编码	下调基因名称	Fold Change
Rn30001407	Btg3	0.4976
Rn30004049	Lin7a	0.4917
R002094_01	Zfp354a	0.4906
R004504_01	Fkbp4	0.4896
R000222_01	Rgs2	0.4764
Rn30008541	Ldha	0.4734
Rn30020438	Dusp11	0.4690
R000010_01	Hprt1	0.4462
R000727_01	Slc16a1	0.4436
R000528_01	Ldha	0.4366
Rn30006391	Adfp	0.4295
Rn30013249	Lox	0.4283
Rn30016047	Tubb2b	0.4244
R002843_01	Gda	0.4144
Rn30026289	Hprt1	0.4041
Rn30016138	Tubb2a	0.4024
Rn30011973	Bcl2a1d	0.3963
R000557_01	Hspb1	0.3951
R001406_01	Ccl3	0.3694
R002205_01	Runx1	0.3511
Rn30009414	Hdc	0.3462
Rn30018071	Hacl1	0.3298
Rn30010859	Mocs2	0.3204
R002464_01	Arntl	0.2559
Rn30017289	Ncapd2	0.2128
Rn30007194	Cgref1	0.2126
Rn30013648	Mug1	0.1752
Rn30017392	C5	0.1454
Rn30023962	Dhrs7	0.1382
R003853_01	Bbox1	0.1158
Rn30026163	Acot5	0.1154
Rn30011488	Adh4	0.0266

## 讨论

1. 关于基因芯片技术在本课题中的运用 正常的发育以及由疾病引起的病理改变都是基因表达变化的结果,基因表达的变化是细胞生命活动调控机制的核心。因此,比较细胞在

不同生理、病理或不同生长发育阶段的基因表达对于认识生命本质具有重要意义。中医证是关于疾病发展过程中某一阶段病因、病性、病位、病势的病理概括,体现了疾病某一阶段或某一特殊的病理状态。基因的表达在中医证的表现中可能发挥重要作用,即基因不同的表达模式可能是特定证的分子学基础。

目前,基因和蛋白组学的手段方法正在被引入中医药领域的研究,如曾有运用蛋白组学技术探测肝郁模型大鼠血清的蛋白组学差异表达的研究<sup>[2]</sup>,及运用基因芯片技术探查脾气虚证免疫相关基因组学<sup>[3]</sup>研究的报道。

全基因表达是利用基因芯片技术,将样品的DNA或RNA与基因芯片上的探针进行杂交,之后运用扫描仪对芯片进行扫描,将采集的图像进行处理分析,得出全基因谱。按照一定标准,筛选出差异常表达基因。基因芯片技术具有较高的稳定性和可靠性,是探索生物表型特征及发现新的功能基因的主要技术手段。

本文之前的系列研究表明,肝郁脾虚证大鼠模型可能涉及到多个系统的病生理变化。鉴于目前还不清楚决定中医肝郁脾虚证的特征性变化基因,本研究则首次利用基因芯片技术对肝郁脾虚证模型大鼠的肝脏差异基因表达进行探测。

2. 肝郁脾虚证大鼠模型相关基因表达谱的变化 本研究发现,肝郁脾虚证模型大鼠肝脏差异表达的基因59个,其中上调基因27个,下调基因32个。在上调的27个基因中,目前已知的功能基因有Scd1、Dbp、Upp2、Slc28a2、Sds、Hpn、Glde、Tm7sf2、Gcat,这些基因的功能主要涉及脂肪代谢、蛋白质代谢、细胞合成等方面。其中Scd1参与脂肪代谢,其表达上调促进脂肪合成;Dbp参与转录,其表达上调促进信使RNA合成;Upp2和Slc28a2参与核酸代谢,其上调促进嘧啶代谢和核苷中钠转运;Sds、Glde、Gcat参与半胱氨酸代谢,其表达上调促进半胱氨酸代谢;Hpn参与胰腺功能,其表达上调则增强胰酶分泌胰蛋白酶功能;Tm7sf2参与固醇代谢,其表达上调促进固醇合成。在下调的32个基因中涉及已知的功能基因有Btg3、Lin7a、Zfp354a、Rgs2、Dusp11、Ldha,这些基因的功能主要涉及细胞生理过程负反馈、蛋白转运、磷脂水解等方面。其中Btg3、Rgs2与细胞生理过程负反馈有关,此二基因下调可抑制细胞生理过程负反馈;Lin7a、Zfp354a与细胞分泌、转运有关,二者表达下调可抑制细胞分泌及蛋白转运;Dusp11参与磷脂水解,其表达下调可抑制磷脂水解;Ldha参与糖酵解,其表达下调可抑制糖酵解过程。本结果提示肝郁脾虚证模型大鼠存在物质代谢方面的异常,涉及到多个基因的异常表达。

值得提出的是,已知基因固醇辅酶A去饱和酶1(Scd1)是细胞中单不饱和脂肪酸合成的限速酶,具有多种重要的生理功能:一方面它是膜磷脂、甘油三酯(TG)、胆固醇酯(CE)等脂质生物合成优先利用的底物,缺乏时会引起脂质酯化障碍<sup>[4]</sup>。利用Scd1基因突变及敲除技术发现Scd1缺陷小鼠脂肪减少,体质量减轻,

肝脏脂质沉积减少, 脂肪酸氧化增强而合成减弱, 极低密度脂蛋白(VLDL)分泌减少。本实验中观察到肝郁脾虚证模型大鼠伴有饮食减少, 体质量减轻等外部形征的变化, 推测肝郁脾虚证模型大鼠Scd1的表达加强可能作为体内代偿性调节的一种结果, 有助于体内脂质酯化及对抗肝脏脂肪合成的减少。

糖酵解是糖在无氧条件下经一系列的酶促反应生成丙酮酸的过程, 其结果生成ATP, 为生物细胞中葡萄糖分解产生能量的共同代谢途径。已知基因Ldha(乳酸脱氢酶A)与丙酮酸亲和力强, 能催化丙酮酸还原成乳酸, 有利于糖酵解。Ldha缺少可影响到糖酵解过程中3-磷酸甘油醛脱氢酶(GA3PD)催化过程中产生的NADH再氧化, 造成3-磷酸甘油醛, 磷酸二羟丙酮, 1,6-二磷酸果糖的堆积。此时增加的NADH和磷酸二羟丙酮通过磷酸甘油醛脱氢酶的作用向 $\alpha$ -磷酸甘油和甘油方向进行<sup>[5]</sup>, 从而减少2个分子ATP生成。据此推测, 肝郁脾虚证模型大鼠肝脏Ldha的下调, 在减少无氧糖酵解过程中供能的同时可能会引起细胞脂代谢的异常。

#### 结语

肝郁脾虚证模型大鼠肝脏出现的差异表达基因涉及到脂类代谢、糖代谢、细胞分裂等多个方面, 提示多个基因的异常表达可能是中医肝郁脾虚证的分子基础。需要指出的是, 由于基因的功能通过相关的功能蛋白质的表达来体现, 基因层面上调或下调不必然与其蛋白的表达一致, 因此基因-蛋白及其确切作用环节和意义有待进一步研究。

#### 参 考 文 献

- [1] 李艳彦, 谢鸣, 陈禹. 肝郁脾虚证大鼠模型复制中的免疫系统变化. 中华中医药杂志, 2006, 21(7): 428-429  
LI Yan-yan, XIE Ming, CHEN Yu. Changes of immune system on syndrome model of stagnation of liver and deficiency of spleen in rats. China Journal of TCM and Pharmacy, 2006, 21(7): 428-429
- [2] 钟小兰, 吕志平, 钱令嘉. 肝郁证模型大鼠血清蛋白组的差异表达研究. 中华中医药杂志, 2006, 21(7): 399-401  
ZHONG Xiao-lan, LV Zhi-ping, QIAN Ling-jia. Differential expression of serum proteome on stagnation on liver QI syndrome model rats. China Journal of TCM and Pharmacy, 2006, 21(7): 399-401
- [3] 罗云坚, 修宗昌, 黄穗平, 等. 脾气虚证免疫相关基因组学机制初探. 中国中西医结合杂志, 2005, 25(4): 313  
LUO Yun-jian, XIU Zong-chang, HUANG Sui-ping, et al. Primary exploration on immune associated genome of patients with Pi-Qi deficiency syndrome. Journal of Integrated Traditional and Western Medicine, 2005, 25(4): 313
- [4] Ntambi J M. Regulation of stearoyl CoA desaturase by polyunsaturated fatty acids and cholesterol. Lipid Res, 1999, 40(9): 1549-2558
- [5] 刘泽军. 乳酸脱氢酶A亚单位基因变异与临床. 日本医学介绍, 1998, 19(2): 89-90  
LIU Ze-jun. LDH-A gene mutation and clinical. Progress in Japanese Medicine, 1998, 19(2): 89-90

(收稿时间: 2010年9月18日)

#### · 研究报告 ·

## 中药复方糖障明对糖尿病大鼠骨髓造血细胞的影响

余蓉<sup>1</sup>, 谢学军<sup>2</sup>, 李翔<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>成都中医药大学附属医院, 成都 610072; <sup>2</sup>成都中医药大学临床医学院, 成都 610075)

**摘要:** 目的: 探讨中药复方糖障明对糖尿病大鼠骨髓造血细胞的影响。方法: 将链脲佐菌素造成糖尿病模型的大鼠随机分为糖障明治疗组(即中药高、中、低3个剂量)、阴性对照组、降糖灵对照组, 以同龄正常大鼠为正常对照组。各实验组在给药2个月后进行骨髓有核细胞的检查。结果: 中药低剂量组的原始+早幼粒细胞明显低于正常对照组( $P < 0.05$ ), 阴性对照组的晚幼粒细胞较正常对照组及降糖灵对照组明显降低( $P < 0.01$ ); 各实验组嗜碱性粒细胞均较正常对照组明显降低( $P < 0.05$ ); 中药低剂量组的单核细胞明显低于降糖灵对照组及正常对照组( $P < 0.05$ )。结论: 中药复方糖障明不仅对骨髓造血系统无抑制作用, 而且低剂量的中药复方糖障明可能还有激活可溶性生长因子, 增强抑制程序性细胞死亡(PCD)活性的作用。

**关键词:** 糖尿病; 骨髓; 造血细胞; 程序性细胞死亡; 糖障明

**基金资助:** 国家中医药管理局重点课题(No.95A2619)

通讯作者: 谢学军, 成都市十二桥路37号成都中医药大学临床医学院眼科教研室, 邮编: 610075, 电话: 028-87783541

E-mail: xxj\_chd@yahoo.com.cn